

クロマチン中のヒストンの脱アセチル

著者	金田 斉
号	533
発行年	1977
URL	http://hdl.handle.net/10097/24042

氏名・（本籍）	かね た ひとし 金 田 齊
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理博第 5 3 3 号
学位授与年月日	昭和 5 2 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学第二専攻
学 位 論 文 題 目	クロマチン中のヒストンの脱アセチル
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 田 宮 信 雄 教 授 高 瀬 嘉 平 教 授 瀬 戸 秀 一

論 文 目 次

第一章 序 論

第二章 実 験 法

第三章 クロマチン中のヒストンを脱アセチルする酵素

第四章 クロマチンヒストンデアセチラーゼ活性と遊離ヒストンデアセチラーゼ活性の
関係

第五章 考 察

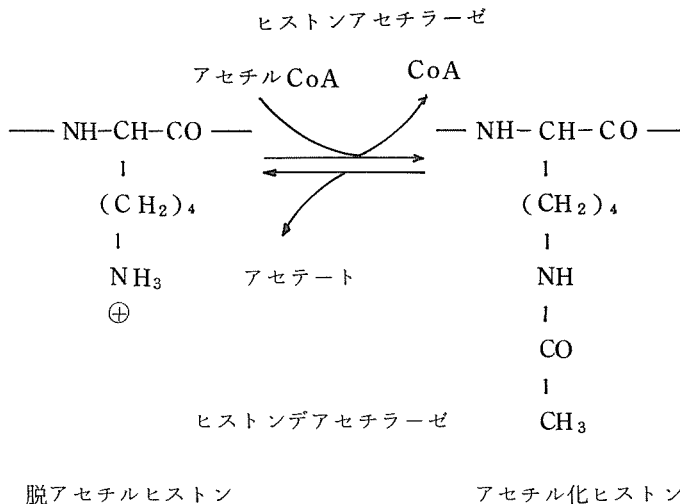
第六章 要 約

論 文 内 容 要 旨

高等生物では遺伝情報の担体，DNAは細胞核内でヒストン，非ヒストン蛋白質およびRNAなどと結合し，クロマチンと呼ばれる複雑な構造体を形成している。

ヒストンはその構成アミノ酸としてリジン，アルギニンに富む塩基性蛋白質である。ヒストンには5種の成分，すなわちH₁，H₂a，H₂b，H₃，H₄があり，これらの分子量は11,000～22,000の範囲にある。子牛胸腺のヒストンH₂a，H₂b，H₃，H₄の一次構造の特徴はN末端側半分が塩基性アミノ酸に富んでいることである。この塩基性領域がDNAのリン酸基との静電結合に関与していると考えられている。

また，ヒストン分子中の多くのリジン残基のうち，特定のリジン残基のε-アミノ基がアセチル化されている。このアセチル化はヒストンH₃，H₄の塩基性領域で主に起っている。これら分子内部のアセチル基はいくつかのヒストン分子のN末端に付いたアセチル基とちがって，細胞核内でヒストン分子からはずれたり，また付いたりしている。ところでこの分子内部のアセチル基の代謝回転を酵素レベルで説明できるかという問題が生じるが，現在までに次のような酵素が見つっている。アセチルコエンザイムAをアセチル基供与体としてヒストンをアセチル化するヒストンアセチラーゼと，当研究室で見いだされたヒストンを脱アセチルするヒストンデアセチラーゼである。こうして一応次式に示すようにヒストンのアセチル基の代謝回転を説明する酵素が出そろったと考えられた。



ところが子牛胸腺全組織から抽出し，部分精製したヒストンデアセチラーゼは遊離のヒストンを脱アセチルするが，クロマチンに結合したヒストンを脱アセチルしない。また子牛胸腺のヒストン

デアセチラーゼ活性の大部分は細胞質に見い出される。したがってこのヒストンデアセチラーゼでは細胞核内でのヒストンのアセチル基の代謝回転を説明することができない。井上らは核にもわずかにヒストンデアセチラーゼが存在することをみていたので、クロマチンヒストンにも作用する別種のヒストンデアセチラーゼの存在を核内に予想し、この研究を始めた。

基質として用いた可溶性クロマチンとヒストンの調整は次のように行った。Gersheyらの方法にしたがい、子牛胸腺核と ^{14}C -アセテートを保温して核内ヒストンのアセチル基を標識した後、ZubayとDotyの方法にしたがって、 $0.075\text{MNaCl}-0.024\text{MEDTA}(\text{pH}8.0)$ で洗浄後、蒸留水に分散し、一晚攪拌してクロマチンを可溶性とした。次に 0.7mM リン酸緩衝液($\text{pH}6.8$)に透析してから、 $70,000\times g$ 、 30 分超遠心して上清を取り、これをクロマチン溶液として用いた。また、可溶性化する前のクロマチンから常法通り 0.25MHCl でヒストンを抽出した。

クロマチンの組成および放射能の分布を調べたところ、従来いろいろな組織から単離されたクロマチンと同様にヒストンはDNAとほぼ等重量存在していた。またクロマチンに含まれる放射能の 85% が酸可溶性画分、すなわちヒストン画分に回収され、クロマチンの放射能の大部分はヒストンに取り込まれていることがわかった。

PanyimとChalkleyの方法に従ってヒストンをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、 5 種のヒストン成分全部が観察された。

酵素活性の測定は通常次のように行った。 ^{14}C -標識クロマチンまたはヒストン(約 1500dpm)を酵素と 0.6ml の 0.025M リン酸緩衝液($\text{pH}7.5$)中で適当な時間保温した後、氷冷し、 0.1ml の $1\text{MHCl}-0.05\text{M}$ 酢酸を加え、次に 3ml の酢酸エチルを加えてはげしく振盪した。遠心して有機層を 2ml 取り、Brayのシンチレーター液 10ml と混ぜ、放射能を測定した。

測定値(cpm)は計数効率によって絶対放射能値(dpm)に換算し、また酢酸エチルの抽出効率による補正も行った。

子牛胸腺核にクロマチン中のヒストンを脱アセチルする酵素の存在が予想されたので、その検索を行った。子牛胸腺 10g から得られた核を 10ml の 0.2M リン酸緩衝液($\text{pH}7.0$)中でホモジナイズし、 0° で 16 時間攪拌した後、 $70,000\times g$ 、 30 分超遠心して上清を取った。この上清を 0.05M リン酸緩衝液($\text{pH}7.5$)- 30% グリセロールに対して透析した。沈澱が少し生じるので再び $70,000\times g$ 、 30 分超遠心してこれを除去、上清を核抽出液とした。

この核抽出液を ^{14}C -標識クロマチンと保温した所、 ^{14}C -アセテートが遊離するのが観察された。ここに見い出されたクロマチンヒストンデアセチラーゼは、クロマチン中のヒストンを脱アセチルし得る新しい酵素であり、既知のアセチル化酵素と合わせて次式に示すように核内でのヒストンのアセチル基の代謝回転を酵素レベルで説明することが可能になったわけである。

(ピーク1)。しかしC/H値は全フラクションを通じて一定ではなかった。Fr II-3のゲル濾過ではこれがいっそうはっきりしている。この場合先のピーク1と同じ位置に溶出するC/H値約0.4の部分とそれより遅れて溶出するC/H値約0.2の部分(ピーク2)がある。Fr I-2でもFr II-3でも先に溶出する。すなわち分子量が大きい部分の方がC/H値が大きいという関係がみられた。なお分子量既知の標準蛋白質の溶出位置から推定するとピーク1の分子量は50万以上、ピーク2のそれは20万である。

Fr I-2, Fr II-3をそれぞれDNA-セルロースカラムによって素通りする画分と吸着する画分に分けた。Fr I-2でもFr II-3でも吸着画分の方が素通り画分よりC/H値が大きいことがわかった。これらの結果はFr I-2およびFr II-3がなおC/H値からみて純粋でないことを示唆し、さらにそれらの酵素のうちC/H値が大きいヒストンデアセチラーゼ画分がDNAに対する親和性をもつことをも示唆する。

DNA-セルロースによるアフィニティークロマトグラフィーに基づいて核抽出液中のいろいろなヒストンデアセチラーゼを相互に分離することを試みた。最も強くDNAに結合するFrA, やや弱く結合するFrB, およびリン酸緩衝液(pH7.5)濃度0.01Mで素通りするFrCの3つの画分を得た。次にこれらの画分をそれぞれSephadex 6Bゲル濾過により分析した。FrA, FrB, FrCにはそれぞれSephadex 6Bゲル濾過で先に述べたピーク1の位置に溶出する, C/H値が互いに異なるヒストンデアセチラーゼ画分が含まれていた。FrCにはその他にピーク2の位置に溶出する, 遊離ヒストンデアセチラーゼ活性の強いヒストンデアセチラーゼ画分が含まれていた。この結果はC/H値が異なる種々のヒストンデアセチラーゼが存在することを示唆する。

クロマチンヒストンデアセチラーゼ活性と遊離ヒストンデアセチラーゼ活性の関係としては次の2つの可能性を対立する両極としていろいろな中間段階を考えることができよう。

- (1) 両活性は同一酵素の同一中心による。
- (2) 両活性はまったく異なる酵素により, それぞれの酵素は一方の活性しか示さない。

両活性の熱安定性の違い, 金属イオンに対する挙動の違いなどから(1)の可能性は否定できる。(2)の可能性は少なくとも現在のところ, 完全に否定することはできない。しかし本研究の結果から種々のクロマトグラフ的性質およびC/H値が違う数種のクロマチンヒストンデアセチラーゼの存在が示唆された。これらが単に(2)のモデルによるクロマチンヒストンデアセチラーゼと遊離ヒストンデアセチラーゼが種々の割合で混ざったものとは考えにくいことから, 上記(1), (2)以外の中間的モデルを考える必要がある。その1つとして遊離ヒストンデアセチラーゼとDNA結合性蛋白質の複合体がクロマチンヒストンデアセチラーゼの本体であるというモデルも考えられるが, 将来の研究にまたねばならない。

論文審査の結果の要旨

金田斉提出の論文はクロマチン中に存在するヒストンのアセチル基を加水分解する酵素，クロマチンヒストンデアセチラーゼの発見，単離，性質を記載したものである。

従来知られていたヒストンデアセチラーゼはクロマチン中のヒストンには作用しない。しかしクロマチン中のヒストンのアセチル基は核内で代謝回転している。この論文は記載された新酵素はこの代謝回転を説明するものである。

酵素の単離精製はDEAEセルロース カラム，セファデックス 6 Bカラム及びDNAセルロースカラムにより行った。その結果ヒストン及びクロマチン中のヒストンの両者に対し，活性をもつ新酵素が得られた。

この酵素は至適作用pH7.2，クロマチン中のヒストンに対する活性がヒストンに対する活性より耐熱不安定である。又クロマチンヒストンに対する活性はマンガン，コバルト カルシウムイオンにより上昇するが遊離ヒストンに対する活性は下る（濃度1mMにおいて）ことを見出した。

以上金田斉提出の論文は金田が自立して研究活動を行う能力と学識を有することを示している。よって金田斉提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。